

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 198 35 219 A 1**

(51) Int. Cl.⁷:
C 12 N 15/82
C 12 N 15/60
C 12 N 9/88
C 07 H 21/04
A 01 H 5/00
// C12Q 1/68, 1/527

(21) Aktenzeichen: 198 35 219.0
(22) Anmeldetag: 5. 8. 1998
(43) Offenlegungstag: 10. 2. 2000

(71) Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

(72) Erfinder:
Reindl, Andreas, Dr., 67134 Birkenheide, DE; Leon
Mejia, Patricia, Prof. Dr., Cuernavaca Morelos, ZZ;
Esteves Palmas, Juan Manuel, Loma Bonita
Tecamac Estado, ZZ; Cantero Gracia, Maria Araceli,
Loma Bonita Cuernavaca Mar., ZZ; Ebneth, Marcus,
06484 Quedlinburg, DE; Herbers, Karin, Dr., 06484
Quedlinburg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) DNA-Sequenz codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und deren Überproduktion in Pflanzen
(55) Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E Biosyntheseleistung durch Überexpression eines pflanzlichen 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase-Gens aus Arabidopsis.

DE 198 35 219 A 1

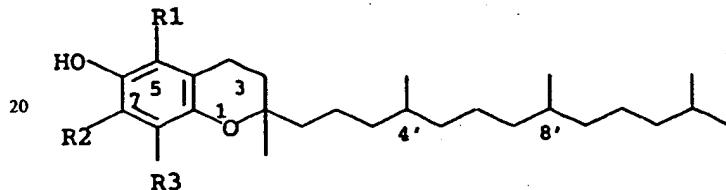
DE 198 35 219 A 1

Beschreibung

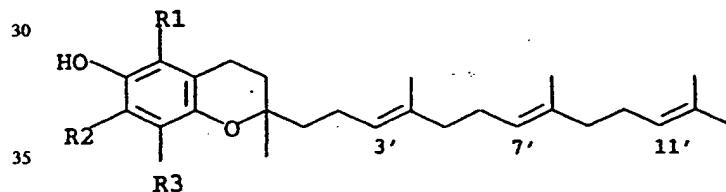
Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder 5 Carotinoid-Gehalt, speziell die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz, einem Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, die derart hergestellte Pflanze selbst, sowie die Verwendung der SEQ ID No. 1 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt 10 an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z. B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols 15 (2a-d):



25 1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 1b, β -Tocopherol [148-03-8]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3, R^2 = \text{H}$
 1c, γ -Tocopherol [54-28-4]: $R^1 = \text{H}, R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 1d, δ -Tocopherol [119-13-1]: $R^1 = R^2 = \text{H}, R^3 = \text{CH}_3$



35 2a, α -Tocotrienol [1721-51-3]: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 2b, β -Tocotrienol [490-23-3]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3, R^2 = \text{H}$
 40 2c, γ -Tocotrienol [14101-61-2]: $R^1 = \text{H}, R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 2d, δ -Tocotrienol [25612-59-3]: $R^1 = R^2 = \text{H}, R^3 = \text{CH}_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt α -Tocopherol.

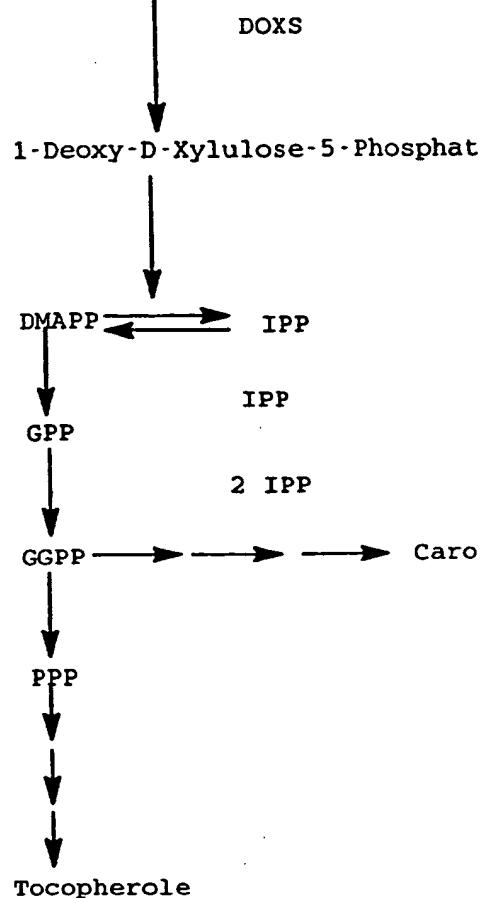
Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese 45 und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Tocopherol-Gehalt bereits in Gewebekultur erfassbar sein und andererseits können nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch wäre die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

50 Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, ein für die Tocopherol Syntheseleistung kodierendes, essentielles Biosynthesegen zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

55 Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus C₅-Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z. B. Carotinoide) bestehen aus C-Skeletten, die ausschließlich auf Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z. B. Chlorophyll) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem aromatischen Kern verbunden ist.

Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-CoA Einheiten, die über β -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit (C₅), dem Isopentenylpyrophosphat (IPP), umge- 60 wandelt werden. Kürzlich wurde durch in vivo Fütterungsexperimente mit C¹³ gezeigt, daß in verschiedenen Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschritten wird:

Glycerinaldehyd-3-Phosphat + Pyruvat



Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat umgewandelt (Schwender et al., FEBS Lett. 414 (1), 129–134 (1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94 (2), 10600–10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95 (5), 2100–2104 (1998); Lichtenhaller et al., FEBS Lett. 400 (3), 271–274 (1997)). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung in IPP umgesetzt (Arigoni et al., 1997). Biochemische Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytosoma, während die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflußt ist (Bach und Lichtenhaller, Physiol. Plant 59 (1983), 50–60). Der Mevalonatunabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyllipiden (Schwender et al., 1997; Arigoni et al. 1997).

IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C₁₀) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen (C₁₅) Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen (C₂₀) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C₄₀-Vorläufer für Carotinoide. GGPP wird durch eine Prenylketten-Hydrogenase zum Phytyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird. Diese wird an PPP gebunden, um den Vorläufer von α -Tocopherol und α -Toccoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zuerst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zylkisierung γ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung α -Tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).

In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß direkional beeinflußen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen

Tomatenpflanzen gemessen werden (Fray und Grierson, *Plant Mol. Biol.* 22 (4), 589–602 (1993); Fray et al., *Plant J.*, 8, 693–701 (1995). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (16): 7608–7612 (1994); Howles et al., *Plant Physiol.* 112, 1617–1624 (1996).

Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden.

Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (DOXS)-Gens in den Pflanzen.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in Pflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression des homologen Gens (Gen aus Organismus der selben Art) erhöht. Dies kann auch durch die Expression eines heterologen Gens (Gens aus entfernten Organismen) erreicht werden. Nukleotidsequenzen sind aus *Arabidopsis thaliana* DOXS (Acc. No. U 27099), Reis (Acc. No. AF024512) und Pfefferminze (Acc. No. AF019383) beschrieben.

In einem Ausführungsbeispiel wird das DOXS-Gen aus *Arabidopsis thaliana* (Seq-ID No.: 1; Mandel et al. *Plant J.* 9, 649–658 (1996); Acc. No. U27099) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Eine Plastidenlokalisierung ist durch die in der Gensequenz enthaltenen Transitsignalsequenz gewährleistet. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DOXS-Gen codiert, das mit Seq-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. vorzugsweise aus anderen Pflanzen stammt.

Das nun vermehrte zur Verfügung stehende GGPP wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide umgesetzt. Die effiziente Bildung von Carotinoiden ist essentiell für die Photosynthese, wobei sie neben den Chlorophyllen als "Lichtsammelner-Komplexe" zur besseren Ausnutzung der Photonenenergie dienen (Heldt, *Pflanzenbiochemie. Spektrum* Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford, 1996). Zusätzlich erfüllen Carotinoide wichtige Schutzfunktionen gegen Sauerstoff-Radikale wie den Singulett-Sauerstoff, den sie wieder in den Grundzustand zurückführen können (Asada, 1994; Demming-Adams und Adams, *Trends in Plant Sciences* 1, 21–26 (1996). Es wurde eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase defekte *Arabidopsis thaliana* Mutante isoliert, die einen "Albino-Phänotyp" zeigt (Mandel et al. 1996). Daraus ist abzuleiten, daß eine verringerte Menge an Carotinoiden in den Plastiden negative Auswirkungen auf die Pflanze hat.

Zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Expression eines DOXS-Gens aus *Arabidopsis* bzw. damit hybridisierenden DNA-Sequenzen und anschließende Testung von Chemikalien auf Hemmung der DOXS-Enzymaktivität.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden *Arabidopsis* und *Raps* eingesetzt.

Die Klonierung des vollständigen DOXS-Gens aus *Arabidopsis* erfolgt über die Isolierung der für das DOXS-Gen spezifischen cDNA (Seq-ID No.: 1).

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenz SEQ ID No. 1, die für eine DOXS oder deren funktionelles Äquivalent kodiert, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z. B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d. h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d. h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiteren regulatorischen Elementen derart, daß jedes der regulatorischen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaic-Virus (Gallie et al., *Nucl. Acids Res.* 15 (1987) 8693–8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 1 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit menspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopaline-Synthase-Promotor
- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgebenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z. B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u. a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet.

Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al. Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459-467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten. Der Aufbau einer derartigen Kassette ist in der Abb. 1 schematisch beispielhaft dargestellt.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T. J. Silhavy, M. L. Bergman und L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792).

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Besonders bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS-Gens in die Chloroplasten vom DOXS-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z. B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DOXS kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DOXS-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptern oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DOXS-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z. B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primerepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z. B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfundungsgemäßen Erfolg kann u. a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al. Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten

DE 198 35 219 A 1

pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z. B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DOXS-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DOXS-kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71–119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u. a. pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promoters die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Produktion eingesetzt werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128–143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205–225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z. B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DOXS-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z. B. durch chemische Synthese erhaltenen, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine DOXS-kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DOXS-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z. B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z. B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DOXS-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Mole-

cular Modelling konstruierter Proteine, die DOXS Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches DOXS-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil, davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z. B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigenen Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf DOXS-Expression möglich ist (z. B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z. B. ein Signal- oder Trans-
sitzpeptid, das das DOXS-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfundungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte sowie Fusionsproteine aus einem Transitzpeptid und einem Polypeptid mit DOXS-Aktivität.

Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DOXS-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DOXS-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze – beispielsweise in fetthaltigen Samen – gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DOXS-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DOXS-Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßme-
rismevermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DOXS-Gens und de-
ren Auswirkung auf die Tocopherol-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ ID No.1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z. B. Gerste, Wei-
zen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Um effiziente Hemmstoffe der DOXS finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-
Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die kom-
plette cDNA-Sequenz der DOXS aus Arabidopsis in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in E. coli über-
exprimiert.

Das mit Hilfe der Expressionskassette exprimierte DOXS-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die DOXS spezifischen Hemmstoffen.

Dazu kann die DOXS beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der DOXS in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen. Methoden zur Aktivitätsbestimmung der DOXS sind beschrieben (Putra et. al., Tetrahedron Letters 39 (1998), 23-26; Sprenger et al., PNAS 94 (1997), 12857-12862).

Mit Hilfe des erfundungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf hemmende Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz Seq ID NO: 1 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- Verwendung einer Pflanze zur Herstellung pflanzlicher DOXS.
- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA Sequenz.
- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS DNA-Sequenz in Pflanzen.
- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA Sequenz zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Klonierungsschritte wie z. B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeföhr.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-1 Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacteriuzn tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850 kann) wurde von Deblaere et al. in (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777) beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103-119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBIN19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-8720) und pBINAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221-230) benutzt werden.

15

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel 1

Herstellung der *Arabidopsis thaliana* DOXS-Transformationskonstrukte

25

Das *Arabidopsis thaliana* DOXS Gen wurde wie in Mandel et al. (1996) beschrieben als vollständige cDNA in den Vektor pBluescript KS- (Stratagene) kloniert.

Zur Herstellung von Überexpressionskonstrukten wurde ein 2.3 kb Fragment (mit F-23-C bezeichnet) über die pBluescript KS- HincII und SacI Schnittstellen isoliert. Diese Sequenz enthält die vollständige DOXS-cDNA vom ATG-Startcodon bis zur EcoRI-Schnittstelle, die 80 bp stromabwärts des Stopcodons liegt. Dieses Fragment wurde über die Schnittstellen SmaI und SacI in den pBIN19 Vektor (Abb. 2) kloniert (Bevan et al., Nucl. Acid Res. 12,8711 (1980), der den 3SS Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (Franck et al., Cell 21 (1), 285-294 (1980) dreimal hintereinander angeordnet enthält.

Zur Herstellung von Antisense-Konstrukten wurde entweder die vollständige cDNA (mit F-23-C bezeichnet) oder ein 700 bp Fragment der 5'-Region in den oben erwähnten pBIN19-Vektor kloniert. Die vollständige DOXS-cDNA wurde über KpnI und SpeI aus dem Polylinker des pBluescript KS- isoliert und in die pBIN19-Polylinker-Schnittstellen XbaI und KpnI kloniert (Abb. 3). Zur Klonierung des 700 bp Fragments wurde die cDNA mit Hilfe der EcoRV Schnittstelle, die an Position 701 der cDNA liegt und der pBS KS-lokalierten SmaI Schnittstelle verdaut. Das entstandene Fragment wurde in den Vektor pBS KS-subkloniert und erneut über die EcoRV und SmaI Schnittstellen in den oben beschriebenen pBIN19-Vektor in Antisense-Orientierung kloniert. Die Transformationen von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit den oben beschriebenen Konstrukten erfolgten mit Agrobakterium *tumefaciens* mit der Vakuum-Infiltrationsmethode (Bent et al., Science 265(1994), 1856-1860). Mehrere unabhängige Transformanden wurden pro Konstrukt isoliert. Jeder Buchstabe (siehe Tabelle 1) bedeutet eine unabhängige transformierte Linie. Aus der daraus erhaltenen T1-Generation wurden Pflanzen auf Homo- oder Heterozygotie untersucht. Mehrere Pflanzen jeder Linie wurden gekreuzt, um eine Segregationsanalyse durchzuführen. Die Nummer in der Tabelle 1 entspricht der individuellen Pflanze, welche für weitere Analysen ausgewählt wurde. Es wurden sowohl homo- als auch heterozygote Linien erhalten. Die Segregationsanalyse der erhaltenen Linien ist in der folgenden Tabelle 1 dargestellt:

50

55

60

65

Tabelle 1

Segregationsanalyse der transgenen DOXS-T2-Pflanzen

LINIEN	SEGREGATION	
A9	75%	5
A19	100%	
B11	75%	10
B4	100%	
C2	100%	
D3	75%	15
D17	100%	
E9	75%	
E14	100%	20
F9	75%	
F14	100%	

Beispiel 2

Nachweis erhöhter DOXS-RNA-Mengen in transgenen Pflanzen

Gesamt RNA aus 15 Tage alten Keimlingen verschiedener transgener Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, wurde nach der Methode von Logeman et al., Anal.Biochem. 163, 16-20 (1987) extrahiert, in einem 1.2% Agarosegel aufgetrennt, auf Filter transferiert und mit einem 2.1 kb langen DOXS-Fragment als Sonde hybridisiert (Abb. 4).

Beispiel 3

Nachweis erhöhter DOXS-Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

Gesamtprotein (Abb. 5) aus 15 Tage alten Keimlingen verschiedener, unabhängiger transgener Pflanzen, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, wurde isoliert und mit einem polyklonalen Anti-DOXS-Antikörper (IgG) in einer Westernanalyse detektiert (Abb. 6).

Beispiel 4

Messung des Carotinoid- und Chlorophyllgehalts

Die Bestimmung der Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllmengen wurde wie in Lichtenhaller und Wellburn (1983) beschrieben mit 100% Acetonextrakten durchgeführt. Die Ergebnisse der Mehrfachmessungen der transgenen Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, sind in der folgenden Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllgehalt der transgenen DOXS-Linien

LINIE	% GESAMT CHLOROPHYLLE	% GESAMT CAROTINOIDE
clal Mutante	5	5
Wild Typ	100	100
B-4	86	89
B-11	84	90
C-2	98	107
D-3	128	135
D-17	136	149
E-14	121	139
F-7	80	90
F-14	85	107

25

Beispiel 5

Transformation von Raps

30 Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen orientiert sich an einem Protokoll von Bade, JB und Damm, B (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30–38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien angegeben sind. Die Transformationen erfolgten mit dem Agrobacterium Stamm LBA4404 (Clontech). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen pBIN19-Konstrukte mit der gesamten DOXS-cDNA verwendet. In diesen pBIN-Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch die OCT-Terminatorsequenz ersetzt. Brassica napus Samen wurden mit 70% (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min in 55°C H₂O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Twenn 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H₂O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10–15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

35 Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtkultur bei 29°C in LB mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml LB ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4–0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der 40 Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt.

45 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die 50 Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt. Zur 55 Regeneration wurden jeweils 20–30 Explanten in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16/8 H inkubiert. Alle 12 Tage wurde die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J. B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30–38) beschrieben durchgeführt.

60

Beispiel 6

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

65 Die cDNA der DOXS wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promoters überexprimiert.

Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenes verwednet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapsamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächs-

DE 198 35 219 A 1

haus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

SEQUENZPROTOKOLL

5

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF AG
- (B) STRASSE: Carl-Bosch
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZahl: 67056
- (G) TELEPHON: 0621-60-52698

10

(ii) ANMELDESTITEL: DOXS

15

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTR GER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

20

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

25

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) L NGE: 2458 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÖLS: cDNA

35

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (B) STAMM: *Arabidopsis thaliana*

40

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: F-23-C

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..2154

45

(x) VERÖFFENTLICHUNGSDATEN:

- (A) AUTORS: Mandel, M

Feldmann, KA
Herrera-Estrella, L
Rocha-Sosa, M
Leon, P

50

(B) TITEL: CLA 1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution.

55

- (C) ZEITSCHRIFT: Plant Journal

- (D) BAND: 9

- (F) SEITEN: 649-658

- (G) DATUM: 1996

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

60

ATG GCT TCT TCT GCA TTT GCT TTT CCT TCT TAC ATA ATA ACC AAA GGA
Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly
1 5 10 15

48

GGA CTT TCA ACT GAT TCT TGT AAA TCA ACT TCT TTG TCT TCT TCT AGA
Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Arg

96

65

DE 198 35 219 A 1

TCT TTG GTT ACA GAT CTT CCA TCA CCA TGT CTG AAA CCC AAC AAC AAT Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn Asn 35 40 45	144
5 TCC CAT TCA AAC AGA AGA GCA AAA GTG TGT GCT TCA CTT GCA GAG AAG Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys 50 55 60	192
10 GGT GAA TAT TAT TCA AAC AGA CCA CCA ACT CCA TTA CTT GAC ACT ATT Gly Glu Tyr Tyr Ser Asn Arg Pro Pro Thr Pro Leu Leu Asp Thr Ile 65 70 75 80	240
15 AAC TAC CCA ATC CAC ATG AAA AAT CTT TCT GTC AAG GAA CTG AAA CAA Asn Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Val Lys Glu Leu Lys Gln 85 90 95	288
20 CTT TCT GAT GAG CTG AGA TCA GAC GTG ATC TTT AAT GTG TCG AAA ACC Leu Ser Asp Glu Leu Arg Ser Asp Val Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr 100 105 110	336
25 GGT GGA CAT TTG GGG TCA AGT CTT GGT GTG GAG CTT ACT GTG GCT Gly Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala 115 120 125	384
30 CTT CAT TAC ATT TTC AAT ACT CCA CAA GAC AAG ATT CTT TGG GAT GTT Leu His Tyr Ile Phe Asn Thr Pro Gln Asp Lys Ile Leu Trp Asp Val 130 135 140	432
35 GGT CAT CAG TCT TAT CCT CAT AAG ATT CTT ACT GGG AGA AGA GGA AAG Gly His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Gly Lys 145 150 155 160	480
40 ATG CCT ACA ATG AGG CAA ACC AAT GGT CTC TCT GGT TTC ACC AAA CGA Met Pro Thr Met Arg Gln Thr Asn Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg 165 170 175	528
45 GGA GAG AGT GAA CAT GAT TGC TTT GGT ACT GGA CAC AGC TCA ACC ACA Gly Glu Ser Glu His Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr 180 185 190	576
50 ATA TCT GCT GGT TTA GGA ATG GCG GTA GGA AGG GAT TTG AAG GGG AAG Ile Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Lys 195 200 205	624
55 AAC AAC AAT GTG GTT GCT GTG ATT GGT GAT GGT GCG ATG ACG GCA GGA Asn Asn Asn Val Val Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly 210 215 220	672
60 CAG GCT TAT GAA GCC ATG AAC AAC GCC GGA TAT CTA GAC TCT GAT ATG Gln Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met 225 230 235 240	720
65 ATT GTG ATT CTT AAT GAC AAC AAG CAA GTC TCA TTA CCT ACA GCT ACT Ile Val Ile Leu Asn Asp Asn Lys Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr 245 250 255	768
70 TTG GAT GGA CCA AGT CCA CCT GTT GGT GCA TTG AGC AGT GCT CTT AGT Leu Asp Gly Pro Ser Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser 260 265 270	816
75 CGG TTA CAG TCT AAC CCG GCT CTC AGA GAG TTG AGA GAA GTC GCA AAG Arg Leu Gln Ser Asn Pro Ala Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys 275 280 285	864
80 GGT ATG ACA AAG CAA ATA GGC GGA CCA ATG CAT CAG TTG GCG GCT AAG Gly Met Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Gln Leu Ala Ala Lys 290 295 300	912

DE 198 35 219 A 1

GTA GAT GTG TAT GCT CGA GGA ATG ATA AGC GGT ACT GGA TCG TCA CTG	960	
Val Asp Val Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Thr Gly Ser Ser Leu		
305 310 315 320		
TTT GAA GAA CTC GGT CTT TAC TAT ATT GGT CCA GTT GAT GGG CAC AAC	1008	5
Phe Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn		
325 330 335		
ATA GAT GAT TTG GTA GCC ATT CTT AAA GAA GTT AAG AGT ACC AGA ACC	1056	10
Ile Asp Asp Leu Val Ala Ile Leu Lys Glu Val Lys Ser Thr Arg Thr		
340 345 350		
ACA GGA CCT GTA CTT ATT CAT GTG GTG ACG GAG AAA GGT CGT GGT TAT	1104	15
Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr		
355 360 365		
CCT TAC GCG GAG AGA GCT GAT GAC AAA TAC CAT GGT GTT GTG AAA TTT	1152	
Pro Tyr Ala Glu Arg Ala Asp Asp Lys Tyr His Gly Val Val Lys Phe		
370 375 380		
GAT CCA GCA ACG GGT AGA CAG TTC AAA ACT ACT AAT GAG ACT CAA TCT	1200	20
Asp Pro Ala Thr Gly Arg Gln Phe Lys Thr Thr Asn Glu Thr Gln Ser		
385 390 395 400		
TAC ACA ACT TAC TTT GCG GAG GCA TTA GTC GCA GAA GCA GAG GTA GAC	1248	25
Tyr Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Val Ala Glu Ala Glu Val Asp		
405 410 415		
AAA GAT GTG GTT GCG ATT CAT GCA GCC ATG GGA GGT GGA ACC GGG TTA	1296	
Lys Asp Val Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Gly Thr Gly Leu		
420 425 430		
AAT CTC TTT CAA CGT CGC TTC CCA ACA AGA TGT TTC GAT GTA GGA ATA	1344	30
Asn Leu Phe Gln Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile		
435 440 445		
GCG GAA CAA CAC GCA GTT ACT TTT GCT GCG GGT TTA GCC TGT GAA CGC	1392	35
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly		
450 455 460		
CTT AAA CCC TTC TGT GCA ATC TAT TCG TCT TTC ATG CAG CGT GCT TAT	1440	40
Leu Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr		
465 470 475 480		
GAC CAG GTT GTC CAT GAT GTT GAT TTG CAA AAA TTA CCG GTG AGA TTT	1488	
Asp Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe		
485 490 495		
GCA ATG GAT AGA GCT GGA CTC GTT GGA GCT GAT GGT CCG ACA CAT TGT	1536	45
Ala Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys		
500 505 510		
GGA GCT TTC GAT GTG ACA TTT ATG GCT TGT CTT CCT AAC ATG ATA GTG	1584	50
Gly Ala Phe Asp Val Thr Phe Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Ile Val		
515 520 525		
ATG GCT CCA TCA GAT GAA GCA GAT CTC TTT AAC ATG GTT GCA ACT GCT	1632	
Met Ala Pro Ser Asp Glu Ala Asp Leu Phe Asn Met Val Ala Thr Ala		
530 535 540		
GTT GCG ATT GAT GAT CGT CCT TCT TGT TTC CGT TAC CCT AGA GGT AAC	1680	
Val Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn		
545 550 555 560		
GGT ATT GGA GTT GCA TTA CCT CCC GGA AAC AAA GGT GTT CCA ATT GAG	1728	60
Gly Ile Gly Val Ala Leu Pro Pro Gly Asn Lys Gly Val Pro Ile Glu		
565 570 575		

65

DE 198 35 219 A 1

ATT GGG AAA GGT AGA ATT TTA AAG GAA GGA GAG AGA GTT GCG TTG TTG Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu 580 585 590	1776
5 GGT TAT GGC TCA GCA GTT CAG AGC TGT TTA GGA GCG GCT GTA ATG CTC Gly Tyr Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu 595 600 605	1824
10 GAA GAA CGC GGA TTA AAC GTA ACT GTA GCG GAT GCA CGG TTT TGC AAG Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys 610 615 620	1872
15 CCA TTG GAC CGT GCT CTC ATT CGC AGC TTA GCT AAG TCG CAC GAG GTT Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val 625 630 635 640	1920
20 CTG ATC ACG GTT GAA GAA GGT TCC ATT GGA GGT TTT GGC TCG CAC GTT Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val 645 650 655	1968
25 GTT CAG TTT CTT GCT CTC GAT GGT CTT CTT GAT GGC AAA CTC AAG TGG Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp 660 665 670	2016
30 AGA CCA ATG GTA CTG CCT GAT CGA TAC ATT GAT CAC GGT GCA CCA GCT Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala 675 680 685	2064
35 GAT CAA CTA GCT GAA GCT GGA CTC ATG CCA TCT CAC ATC GCA GCA ACC Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr 690 695 700	2112
40 GCA CTT AAC TTA ATC CGT GCA CCA AGG GAA GCT CTG TTT TGAGAGTAAG Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe 705 710 715	2161
45 AATCTGTTGG CTAAAACATA TGTATACAAA CACTCTAAAT GCAACCCAAG GTTTCTTCTA AGTACTGATC AGAATTCCCG CCCGAGAAGT CCTTTGGCAA CAGCTATATA TATTTACTAA GATTGTGAAG AGAAAGGCAA AGGCAAAGGT TGTGCAAAGA TTAGTATTAT AGATAAAACT GGTATTGTT TTGTAATTTT AGGATTGTGA TGAGATCGTG TTGTACCAAT AACTAACATC TTGTAAAATC AATTACTCTC TTGTGATCTT CAATAAGCTT GAGTGACAAA AAAAAAA	2221 2281 2341 2401 2458
50 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2: (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA: (A) L NGE: 717 Aminos <u>uren</u> (B) ART: Aminos <u>ure</u> (D) TOPOLOGIE: linear	
55 (ii) ART DES MOLEK <u>LS</u> : Protein	
60 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2: Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly 1 5 10 15	
65 Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Arg 20 25 30	
70 Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn Asn 35 40 45	
75 Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys 50 55 60	

DE 198 35 219 A 1

Gly	Glu	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Leu	Leu	Asp	Thr	Ile		
65											75				80		
Asn	Tyr	Pro	Ile	His	Met	Lys	Asn	Leu	Ser	Val	Lys	Glu	Leu	Lys	Gln		5
					85				90					95			
Leu	Ser	Asp	Glu	Leu	Arg	Ser	Asp	Val	Ile	Phe	Asn	Val	Ser	Lys	Thr		
					100			105					110				
Gly	Gly	His	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Gly	Val	Val	Glu	Leu	Thr	Val	Ala		10
					115			120				125					
Leu	His	Tyr	Ile	Phe	Asn	Thr	Pro	Gln	Asp	Lys	Ile	Leu	Trp	Asp	Val		
					130			135			140						
Gly	His	Gln	Ser	Tyr	Pro	His	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Arg	Arg	Gly	Lys		15
					145			150			155			160			
Met	Pro	Thr	Met	Arg	Gln	Thr	Asn	Gly	Leu	Ser	Gly	Phe	Thr	Lys	Arg		
					165				170			175					
Gly	Glu	Ser	Glu	His	Asp	Cys	Phe	Gly	Thr	Gly	His	Ser	Ser	Thr	Thr		20
					180			185			190						
Ile	Ser	Ala	Gly	Leu	Gly	Met	Ala	Val	Gly	Arg	Asp	Leu	Lys	Gly	Lys		25
					195			200			205						
Asn	Asn	Asn	Val	Val	Ala	Val	Ile	Gly	Asp	Gly	Ala	Met	Thr	Ala	Gly		
					210			215			220						
Gln	Ala	Tyr	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Ala	Gly	Tyr	Leu	Asp	Ser	Asp	Met		30
					225			230			235			240			
Ile	Val	Ile	Leu	Asn	Asp	Asn	Lys	Gln	Val	Ser	Leu	Pro	Thr	Ala	Thr		
					245				250			255					
Leu	Asp	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Val	Gly	Ala	Leu	Ser	Ser	Ala	Leu	Ser		35
					260			265			270						
Arg	Leu	Gln	Ser	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu	Arg	Glu	Val	Ala	Lys		
					275			280			285						
Gly	Met	Thr	Lys	Gln	Ile	Gly	Gly	Pro	Met	His	Gln	Leu	Ala	Ala	Lys		40
					290			295			300						
Val	Asp	Val	Tyr	Ala	Arg	Gly	Met	Ile	Ser	Gly	Thr	Gly	Ser	Ser	Leu		
					305			310			315			320			
Phe	Glu	Glu	Leu	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Pro	Val	Asp	Gly	His	Asn		45
					325				330			335					
Ile	Asp	Asp	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Glu	Val	Lys	Ser	Thr	Arg	Thr		50
					340			345			350						
Thr	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	His	Val	Val	Thr	Glu	Lys	Gly	Arg	Gly	Tyr		
					355			360			365						
Pro	Tyr	Ala	Glu	Arg	Ala	Asp	Asp	Lys	Tyr	His	Gly	Val	Val	Lys	Phe		55
					370			375			380						
Asp	Pro	Ala	Thr	Gly	Arg	Gln	Phe	Lys	Thr	Thr	Asn	Glu	Thr	Gln	Ser		
					385			390			395			400			
Tyr	Thr	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Val	Asp		60
					405				410			415					
Lys	Asp	Val	Val	Ala	Ile	His	Ala	Ala	Met	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Leu		
					420			425			430						

DE 198 35 219 A 1

Asn Leu Phe Gln Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile
 435 440 445
 Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly
 5 450 455 460
 Leu Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr
 465 470 475 480
 10 Asp Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe
 485 490 495
 Ala Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys
 500 505 510
 15 Gly Ala Phe Asp Val Thr Phe Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Ile Val
 515 520 525
 Met Ala Pro Ser Asp Glu Ala Asp Leu Phe Asn Met Val Ala Thr Ala
 530 535 540
 20 Val Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
 545 550 555 560
 Gly Ile Gly Val Ala Leu Pro Pro Gly Asn Lys Gly Val Pro Ile Glu
 25 565 570 575
 Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu
 580 585 590
 30 Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu
 595 600 605
 Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys
 610 615 620
 35 Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val
 625 630 635 640
 Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val
 645 650 655
 40 Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp
 660 665 670
 Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala
 675 680 685
 45 Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr
 690 695 700
 Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe
 50 705 710 715

Patentansprüche

55 1. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur
 Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
 2. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz kodierend
 für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an
 Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
 3. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhte Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-
 Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-
 Sequenz in Pflanzen exprimiert wird.
 4. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthal-
 tend einen Promotor und eine DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Pro-
 toplasten von Pflanzenzellen einbringt.
 60 5. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfor-
 mation mit Hilfe des Stammes Agrobacterium tumefaciens, der Elektroporation oder der particle bombardment Me-
 thode erfolgt.
 65 6. Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehalt enthaltend eine Express-

DE 198 35 219 A 1

sionskassette gemäß Anspruch 4.
7. Pflanze nach Anspruch 6, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.
8. Verwendung der SEQ ID No. 1 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.
9. Testsystem basierend auf der Expression einer Expressionskassette gemäß Anspruch 4 zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.
10. Verwendung einer Pflanze enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung pflanzlicher DOXS.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

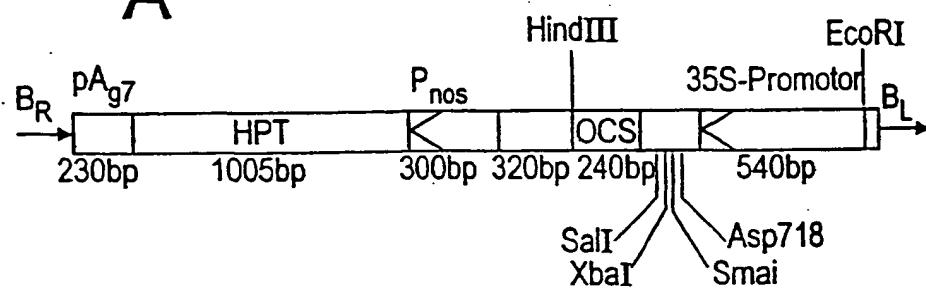
60

65

- Leerseite -

Abbildung 1

A



B

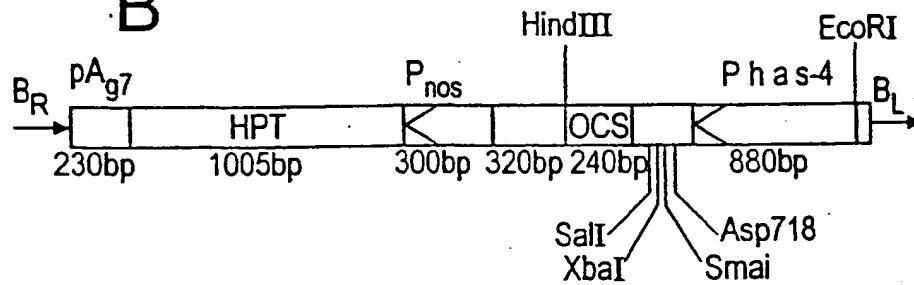


Abbildung 2

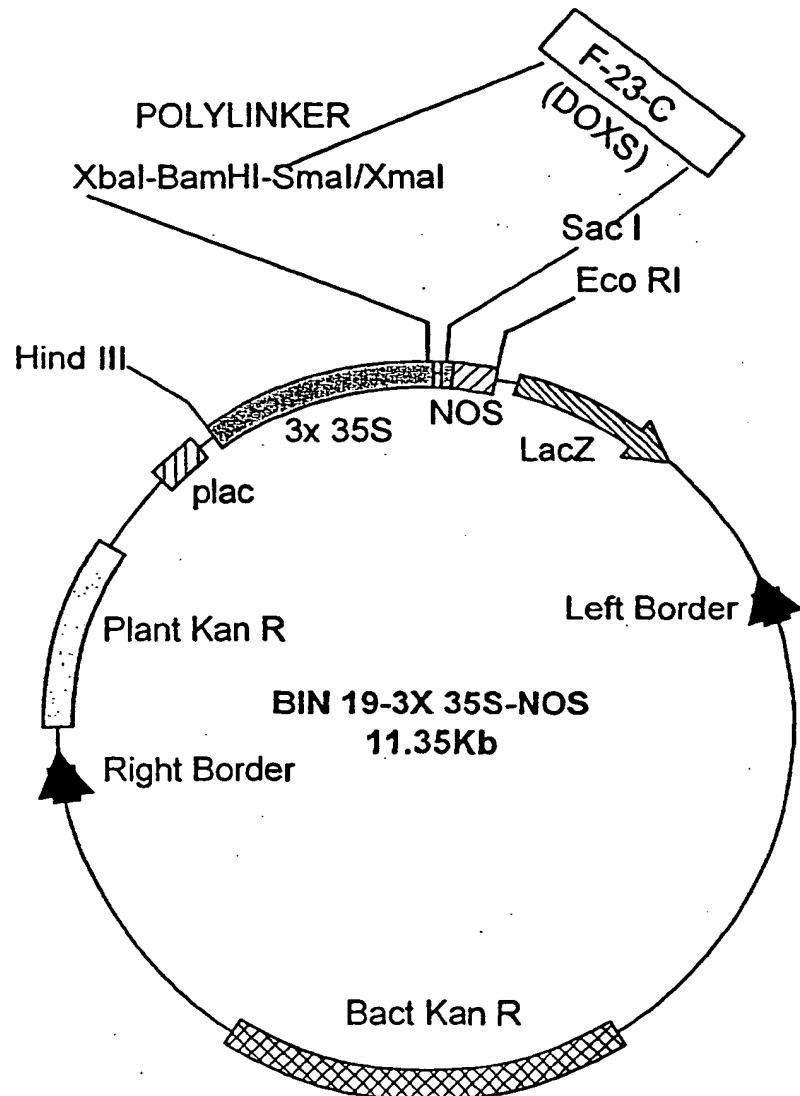


Abbildung 3

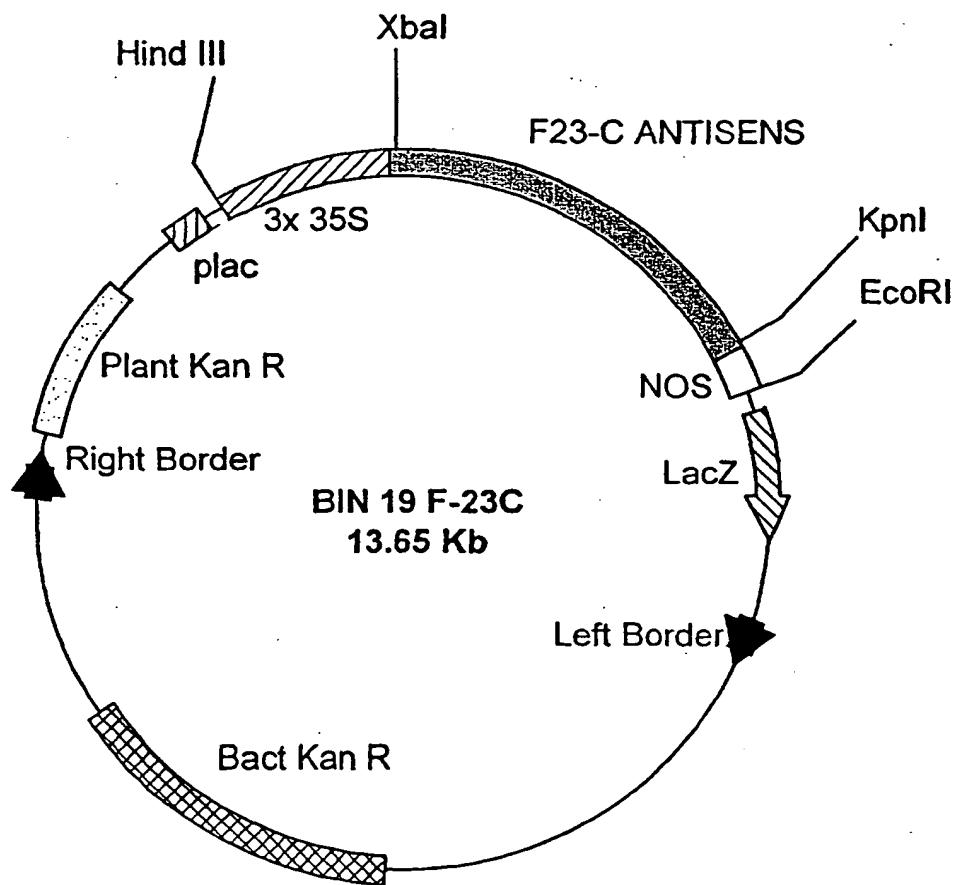


Abb. 4: RNA Expressionslevel des DOXS-Gens

A9 WT WT B4 B11 C2 K14 E9 D17 D3 F9 A19



Abb. 5: Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

MW WT A19 B4 C2 D17 E14 F14 F7 D3



Abb. 6: Westernanalyse

MW WT A19 B4 C2 D17 E14 F14 F7

